

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 32620121150551

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

轮状病毒内衣壳蛋白 VP6 抗体的体内外保
护性研究

Investigation of the in vitro and in vivo protective activity of
antibody against rotavirus inner capsid protein VP6

俞林岐

指导教师姓名: 夏宁邵 教授

葛胜祥 副教授

专 业 名 称: 流行病与卫生统计

论文提交日期: 2015 年 4 月

论文答辩时间: 2015 年 5 月

学位授予日期: 2015 年 6 月

答辩委员会主席: 周裕林

评 阅 人: _____

2015 年 5 月

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心)课题(组)的研究成果,获得(国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心)课题(组)经费或实验室的资助,在(国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博士论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ☒ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

摘 要.....	IX
Abstract.....	XI
缩略词	XIII
前 言.....	1
1 轮状病毒基本特征	1
2 轮状病毒基因组	2
3 轮状病毒蛋白结构与功能	3
3.1 轮状病毒结构蛋白.....	3
3.2 轮状病毒非结构蛋白.....	7
4 轮状病毒流行病学	7
4.1 轮状病毒的分类.....	7
4.2 传染源、传播途径和易感人群.....	8
4.3 流性特征	8
5 轮状病毒的感染与致病	11
5.1 轮状病毒感染过程.....	11
5.2 轮状病毒致病机理.....	13
6 轮状病毒动物评价模型	14
7 轮状病毒预防与免疫保护机制	15
7.1 轮状病毒的预防.....	15
7.2 轮状病毒的疫苗进展	15
7.4 轮状病毒免疫保护机制	17
8 本研究的目的、意义及主要内容	20
8.1 本研究目的与意义	20
8.2 主要研究内容	20
材料和方法	21

1 材料	21
1.1 主要仪器.....	21
1.2 细胞、病毒株、抗体及实验动物.....	22
1.3 引物与探针.....	22
1.4 酶.....	22
1.5 试剂.....	23
1.6 细胞培养及常用溶液配制.....	23
2 方法	25
2.1 细胞传代、复苏及冻存.....	25
2.2 轮状病毒的培养.....	26
2.3 轮状病毒 DLP 体外转录体系.....	27
2.4 Transwell 系统建立.....	28
2.5 Elispot 检测中和抗体.....	29
2.6 单抗 IgG 型转 IgA.....	30
2.7 动物实验.....	34
2.8 间接酶联免疫吸附法检测血清中的抗体.....	36
结果与分析	37
1 轮状病毒 DLP 转录体系建立与 VP6 抗体评价	37
1.1 轮状病毒体外转录模型原理.....	37
1.2 轮状病毒体外转录体系建立.....	37
1.3 轮状病毒 VP6 单抗对 DLP 转录活性的影响.....	40
1.4 dl2/6-VLP 免疫血清对 DLP 转录活性的影响.....	41
1.5 DLP 转录活性评价小结	42
2 VP6 抗体细胞内功能评价	43
2.1 验证 VP6 单抗胞外中和效果	43
2.2 Transwell 系统.....	43
2.3 VP6 单抗型转及 IgA 表达纯化	44
2.4 Transwell 小室建立.....	46
2.5 VP6 单抗对病毒复制的作用	48
2.6 dl2/6-VLP 免疫血清对病毒复制的作用	50
2.7 VP6 抗体细胞内功能评价小结	51

3 VP6 抗体乳鼠体内保护性评价	51
3.1 乳鼠被动免疫模型建立依据.....	51
3.2 轮状病毒 VP6 单抗对乳鼠腹泻的影响	52
3.3 dl2/6-VLP 免疫血清对乳鼠腹泻的影响	54
3.4VP6 抗体乳鼠体内保护性评价小结	54
讨 论.....	55
1 轮状病毒感染及其免疫保护机制	55
2 体外转录模型用于 VP6 抗体保护性评价的优势和局限性	57
3 Transwell 模型用于 VP6 抗体保护性评价的优势和局限性	58
4 被动免疫模型用于 VP6 抗体保护性评价的优势和局限性.....	59
5 基于 VP6 构建的基因工程亚单位疫苗	60
总结与展望	62
参考文献	63
致 谢.....	77

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Chinese abstract.....	IX
English abstract.....	XI
Abbreviations	XIII
Introduction.....	1
1 The characteristics of rotavirus	1
2 The genome of rotavirus.....	2
3 Protein struction and function of rotavirus.....	3
3.1 Structural peoteins of rotavirus.....	3
3.2 Non-structural proteins of rotavirus.....	7
4 The epidemiology of rotavirus	7
4.1 The classification of rotavirus.....	7
4.2 The route of transmission.....	8
4.3 The epidemiologic features.....	8
5 Infection and pathopoiesia of rotavirus	11
4.1 The infection process of rotavirus.....	11
4.2 Pathogenesis.....	13
6 Animal models	14
7 Prevention and immune protection of rotavirus	15
7.2 The prevention and treatment of etiology	15
7.3 The history of vaccine of rotavirus	15
7.4 The immune protection mechanism of rotavirus	17
8 The significance and contents of this research	20
8.1 Purpose and significance of this research	20
8.2 Main content	20
Materials and methods	21

1 Materials	21
1.1 Main instruments	21
1.2 Cells, viruses, antibody and animals.....	22
1.3 Primer and probe.....	22
1.4 Enzyme	22
1.5 Reagents.....	23
1.6 Medium and solution	23
2 Methods.....	25
2.1 Commonly used methods of cell experiments	25
2.2 Culture and concentration of rotavirus	26
2.3 In vitro DLP transcriptase evaluation system of rotavirus.....	27
2.4 Transwell system establishment.....	28
2.5 The detection of neutralizing antibody by Elispot.....	29
2.6 Antibody of IgG change to IgA	30
2.7 Methods for animal experiment	34
2.8 The detection of antibodies in sera by inderect ELISA	36
Results and analysis.....	37
1 Rotavirus DLP transcription system establishment and anti-VP6 antibody evaluation.....	37
1.1 The principles of system	37
1.2 The establishment of system for rotavirus	37
1.3 Evaluation of antibodies by transcription system	40
1.4 Evaluation of anti-dl2/6-VLP serum by transcription system	41
1.5 The summary	42
2 Evaluation of VP6's antibodies function in vitro	43
2.1 The antibody neutralizing effect by Elispot.....	43
2.2 The principles of Transwell system	43
2.3 The expression and purification of IgA	44
2.4 The establishment of Transwell system	46
2.5 Evaluation of antibodies inhibition replication of virus	48
2.6 Evaluation of anti-dl2/6-VLP serum inhibition replication of virus.....	50
2.7 The summary	51

3 Evaluation of anti-VP6 antibody by passive immunity model.....	51
3.1 The establishment of passive immunity model.....	51
3.2 Evaluation of VP6's antibodies function in vivo	52
3.3 Evaluation of anti-dl2/6-VLP serum function in vivo	54
3.4 The summary	54
Discussion.....	55
1 Rotavirus infection and immune protection mechanism	55
2 The advantages and limitations of transcription model in vitro	57
3 The advantages and limitations of Transwell system	58
4 The advantages and limitations of passive immunity model	59
5 Based on the VP6 construct gene recombinant vaccine	60
Conclusions and out look	62
References	63
Acknowledgement.....	77

厦门大学博士论文摘要库

摘要

轮状病毒（Rotavirus）是全球范围内引起婴幼儿腹泻的主要病原体之一，每年导致 40-60 万死亡病例和超过 200 万住院病例，造成严重的社会经济负担。安全有效的疫苗是控制轮状病毒的重要手段，目前已经有 3 种减毒活疫苗上市，并且在欧美等国具有较高的安全性和有效性。但是，这些疫苗在轮状病毒导致死亡率较高的非洲和亚洲地区有效性较低，且会增加患肠套叠的风险，存在一定的安全问题。因此，更加高效、安全的基因工程疫苗的研究已经成为轮状病毒疫苗研究的主要方向。

研究表明，针对 VP6 蛋白的 IgA 抗体可有效抑制轮状病毒的转录进而抑制病毒在体内的复制，VP6 蛋白已经成为轮状病毒基因工程疫苗研究的一个重要方向。本课题组在前期研究中通过大肠杆菌系统以可溶形式表达了轮状病毒的 VP2 和 VP6 蛋白，在体外成功的组装了双层病毒样颗粒 dl2/6-VLP，并通过小鼠母传抗体模型证实针对 dl2/6-VLP 的抗体可有效降低轮状病毒导致的腹泻。但是，针对 VP6 蛋白的抗体在体外不能中和轮状病毒的感染，VP6 蛋白的免疫保护性仅能通过动物模型进行评价，限制了基于 VP6 蛋白的轮状病毒疫苗的发展。本研究的目即在于建立轮状病毒 VP6 抗体保护性研究的体内、体外评价方法，为基于轮状病毒 VP6 蛋白疫苗的免疫保护性评价奠定基础。

轮状病毒基因组的转录和复制不依赖于宿主细胞的酶，脱去外衣壳的双层病毒颗粒即具有转录功能，基于这一特征本研究首先建立了轮状病毒特有的体外转录体系，并证实 VP6 单抗及 dl2/6-VLP 免疫血清可以显著降低轮状病毒 DLP 的转录活性；其次，VP6 抗体进入细胞后才能抑制轮状病毒的复制，极化的 Caco-2 细胞可以有效的通过 pIgR 将 IgA 抗体从细胞的一侧转运至另一侧，因此，建立了基于 Caco-2 细胞的 Transwell 细胞模型，证实了针对 VP6 蛋白的 IgA 抗体可以有效的转运并抑制轮状病毒在 Caco-2 细胞中的复制；最后，本研究还建立了乳鼠被动免疫模型，并通过该模型证实针对 VP6 蛋白的 IgA 抗体和免疫血清均可有效的降低轮状病毒感染导致的腹泻。

综上所述，本研究建立了轮状病毒 VP6 抗体保护性的体内、体外评价手段并证实 VP6 抗体在体内外均可抑制轮状病毒的复制，可为轮状病毒疫苗免疫保护机制的研究提供一定的依据。

关键词：轮状病毒；VP6 蛋白；Transwell 系统；IgA；被动免疫模型

厦门大学博硕士论文摘要库

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.